

## Tepung terigu sebagai bahan makanan





## Daftar isi

Daftar isi .....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Komposisi .....	1
4 Syarat mutu .....	2
5 Pengambilan contoh .....	2
6 Cara uji .....	4
7 Syarat lulus uji .....	5
8 Pengemasan .....	5
9 Penandaan .....	5
Lampiran A (normatif) Cara uji parameter produk tepung terigu sebagai bahan makanan	6
Tabel 1 Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan.....	2
Tabel 2 Jumlah contoh yang harus diambil.....	3
Tabel 3 Cara uji parameter tepung terigu sebagai bahan makanan.....	4
Tabel 4 Larutan asam folat standar.....	21
Tabel 5 Larutan contoh untuk uji asam folat.....	21
Tabel 6 Reaksi biokimia E. coli pada uji IMVIC.....	33
Tabel 7 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran.....	34
Gambar 1 Alat pengambil contoh bentuk tombak tunggal.....	3
Gambar 2 Alat pengambil contoh bentuk sekop ganda.....	3
Gambar B.1 Metoda pengenceran.....	29



## Prakata

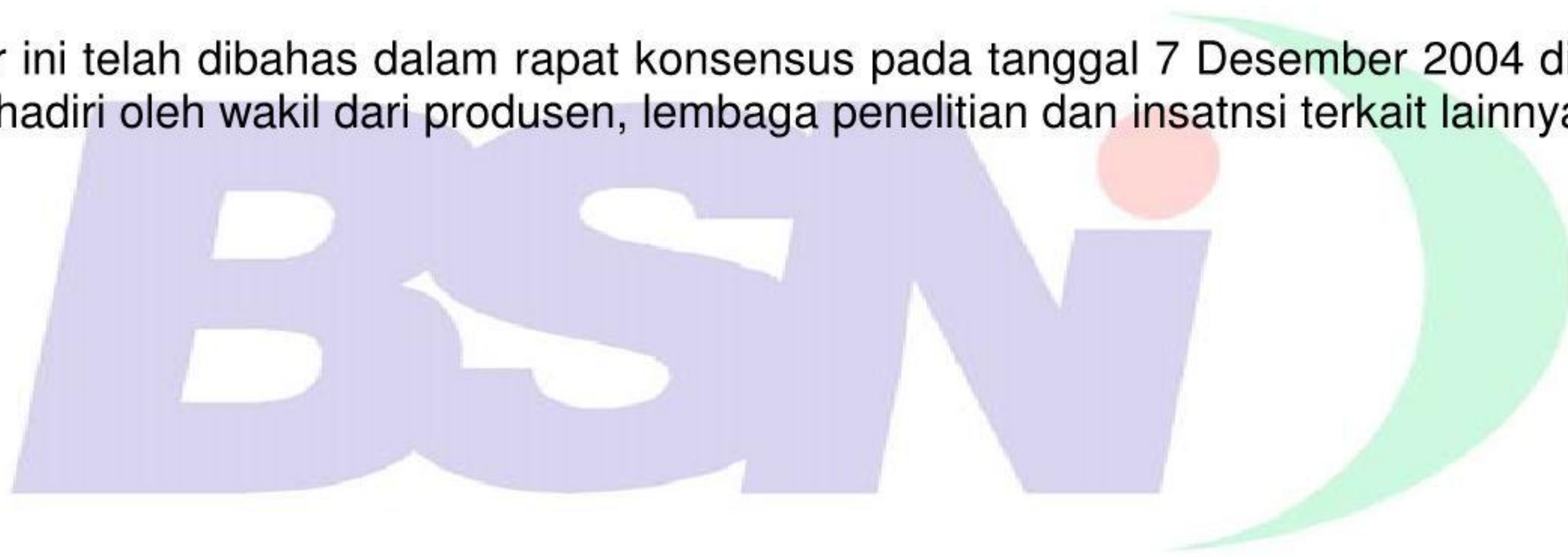
Standar Nasional Indonesia (SNI) Tepung terigu sebagai bahan makanan ini merupakan revisi SNI 01-3751-2000, *Tepung terigu sebagai bahan makanan* yang dirumuskan oleh Panitia Teknis Makanan dan Minuman. Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan industri tepung terigu.

Di dalam perumusan standar ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan iklan pangan
3. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 722/Menkes/Per/IX/88 tentang Bahan Tambahan Makanan
4. SK Menteri Kesehatan RI No. 1452/Menkes/SK/X/2003 tentang Fortifikasi Tepung Terigu

Standar ini telah dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Desember 2004 di Jakarta yang dihadiri oleh wakil dari produsen, lembaga penelitian dan insatnsi terkait lainnya.





## Tepung terigu sebagai bahan makanan

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji untuk tepung terigu sebagai bahan makanan.

Standar ini tidak berlaku untuk:

- tepung terigu yang dibuat dari gandum jenis durum (*Triticum durum Desf*);
- produk gandum keseluruhan (*whole meal*) dan semolina (*Farina*);
- tepung terigu yang ditunjukkan untuk penggunaan bir (*Brewing adjunct*) atau untuk pembuatan pati dan / atau gluten;
- tepung untuk keperluan non makanan;
- tepung terigu yang telah mengalami perlakuan khusus, selain perlakuan pengeringan, pemucatan.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **tepung terigu sebagai bahan makanan**

tepung yang dibuat dari endosperma biji gandum *Triticum aestivum* L. (*Club wheat*) dan / atau *Triticum compactum* Host atau campuran keduanya dengan penambahan Fe, Zn, Vitamin B1, Vitamin B2 dan asam folat sebagai fortifikan

#### 2.2

##### **benda asing**

benda selain tepung terigu yang berasal dari kulit tanaman lain, tanah, batu-batuan, dan pasir

### 3 Komposisi

#### 3.1 Bahan baku utama

Gandum

#### 3.2 Bahan baku lain yang harus ditambahkan

- Vitamin B1(thiamin).
- Vitamin B2(riboflavin).
- Asam folat.
- Besi (Fe).
- Seng(Zn).

#### 3.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan (BTP) yang diizinkan untuk produk tepung terigu sesuai dengan peraturan tentang BTP.



#### 4 Syarat mutu

**Tabel 1 Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan**

No.	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bentuk	-	serbuk
1.2	Bau	-	normal (bebas dari bau asing)
1.3	Warna	-	putih, khas terigu
2	Benda asing	-	tidak ada
3	Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak	-	tidak ada
4	Kehalusan, lolos ayakan 212 $\mu$ m No. 70 (b/b)	%	min 95
5	Kadar air (b/b)	%	maks. 14,5
6	Kadar abu (b/b)	%	maks. 0,6
7	Kadar protein(b/b)	%	min. 7,0
8	Keasaman	mg KOH/100g	maks 50
9	<i>Falling number</i> (atas dasar kadar air 14%)	detik	min. 300
10	Besi (Fe)	mg/kg	min. 50
11	Seng (Zn)	mg/kg	min. 30
12	Vitamin B1 (thiamin)	mg/kg	min. 2,5
13	Vitamin B2(riboflavin)	mg/kg	min. 4
14	Asam folat	mg/kg	min. 2
15	Cemaran logam		
15.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,00
15.2	Raksa (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
15.3	Tembaga (Cu)	mg/kg	maks.10
16	Cemaran Arsen	mg/kg	maks. 0,50
17	Cemaran mikroba		
17.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. $10^6$
17.2	<i>E.coli</i>	APM/g	maks. 10
17.3	Kapang	koloni/g	maks. $10^4$

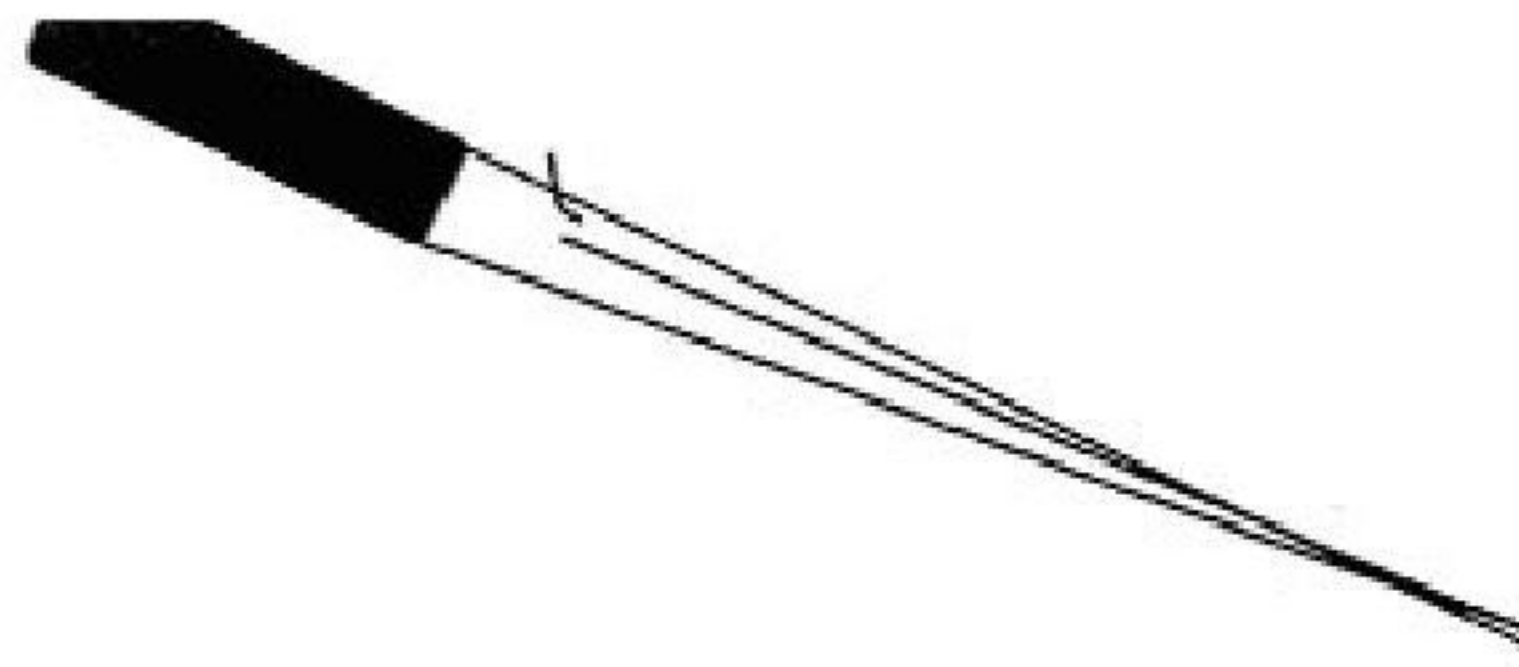
#### 5 Pengambilan contoh

##### 5.1 Cara pengambilan contoh

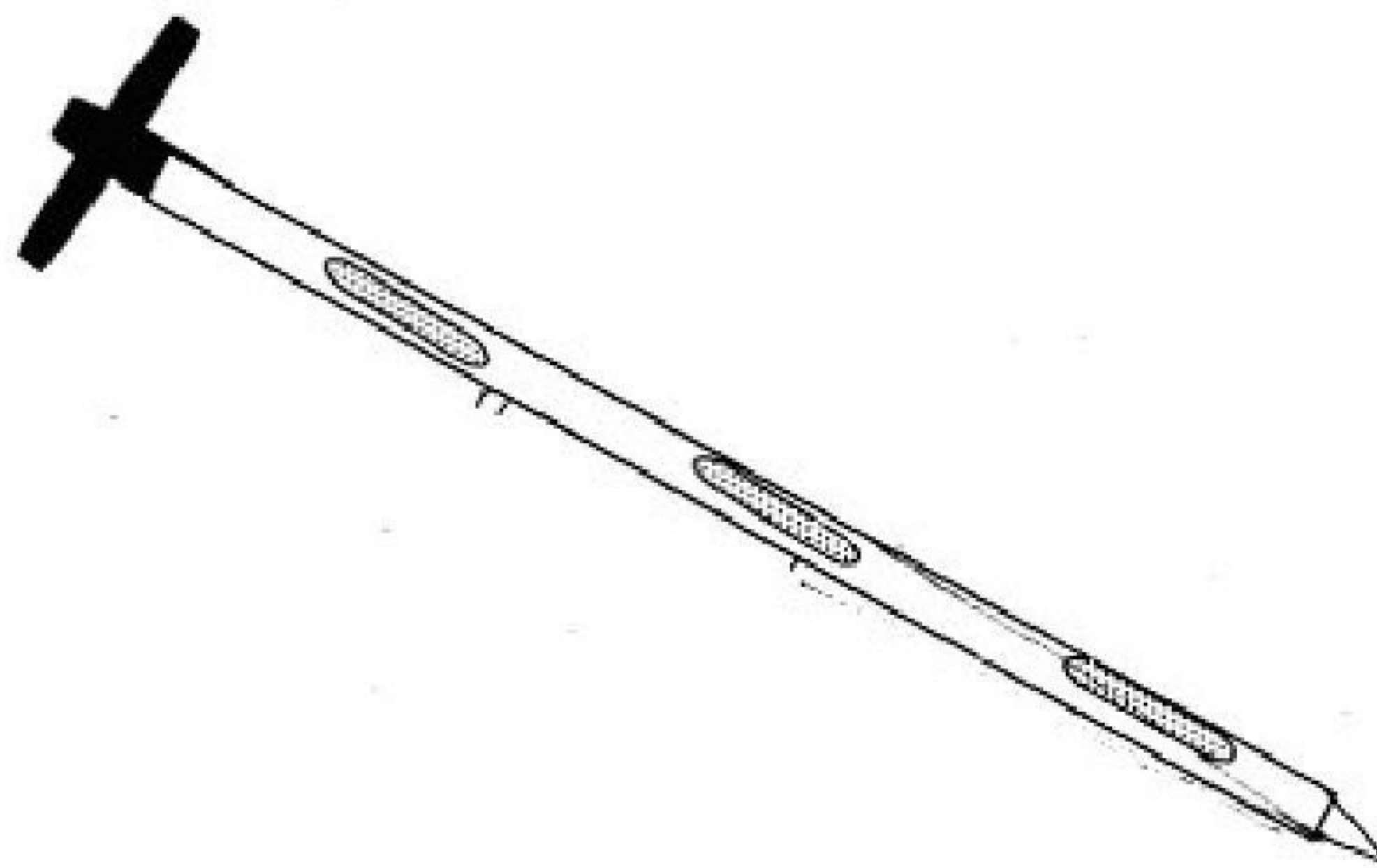
##### 5.1.1 Peralatan

- Alat pengambilan contoh dapat berbentuk tombak maupun sekop berdiameter 1/2" (13 mm), slit  $\geq$  1/3 lingkaran (lihat Gambar 1 dan Gambar 2 )
- Kayu pembagi
- Kantong pengemas/plastik yang terbuat dari bahan yang tidak mempengaruhi sifat kimia contoh
- Sealer /penutup





**Gambar 1 Alat pengambil contoh bentuk tombak tunggal**



**Gambar 2 Alat pengambil contoh bentuk sekop ganda**

## 5.1.2 Cara kerja

### 5.1.2.1 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh menggunakan alat yang bersih dan kering ,dilaksanakan di tempat yang terlindung dari hal-hal yang dapat mempengaruhi contoh. Pengambilan contoh dalam karung dilakukan secara acak sesuai dengan Tabel 2.

**Tabel 2 Jumlah contoh yang harus diambil**

Jumlah contoh per lot (karung/peti)	Jumlah contoh yang harus diambil (karung/peti)
s/d 10	Semua contoh
11-25	5
26-50	7
51-100	10
>100	Akar pangkat dua dari jumlah contoh

Apabila jumlah tanding lebih dari 1000 karung, maka harus dibuat tanding baru sesuai dengan jumlah masing-masing bagian diakar pangkat dua.



Dari setiap karung yang disampel, ambil contoh dengan cara menusukan alat skop pada sudut bagian atas, tengah dan bawah secara diagonal atau vertikal, kemudian diaduk dan dilakukan kuatering sampai mencapai sejumlah contoh yang diperlukan untuk analisis.

### 5.1.2.2 Penanganan contoh

Contoh dikemas sedemikian rupa sehingga terlindung selama pengangkutan serta diberi label yang mencantumkan tanggal pengambilan contoh dan keterangan lain. Berat masing-masing contoh minimal 1 kg. Untuk uji mikrobiologi pengambilan contoh dilakukan secara aseptik.

## 5.2 Persiapan contoh

Sebelum contoh dianalisis, contoh diaduk hingga homogen dengan cara membolak-balikkan lebih dari 25 kali. Hindari contoh dari cahaya matahari dan kelembaban dan selalu disimpan dalam keadaan tertutup rapat untuk menghindari kerusakan contoh.

## 6 Cara uji

**Tabel 3 Cara uji parameter tepung terigu sebagai bahan makanan**

No.	Jenis uji	Metode uji sesuai lampiran
1	Keadaan	A.1
1.1	Bentuk	
1.2	Bau	
1.3	Warna	
2	Benda asing	A.2
3	Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak	A.3
4	Kehalusan, lolos ayakan 212 $\mu\text{m}$ (No. 70)	A.4
5	Air	A.5
6	Abu	A.6
7	Protein ( $N \times 5.7$ )	A.7
8	Keasaman	A.8
9	<i>Falling number</i>	A.9
10	Besi (Fe)	A.10
11	Seng (Zn)	A.11
12	Vitamin B1 (thiamin)	A.12
13	Vitamin B2 (riboflavin)	A.12
14	Asam folat	A.13
15	Cemaran logam	
15.1	Timbal (Pb)	A.14
15.2	Raksa (Hg)	
15.3	Tembaga (Cu)	
16	Cemaran arsen	A.15
17	Cemaran mikroba	
17.1	Angka lempeng total	A.16
17.2	<i>E.coli</i>	
17.3	Kapang	



## 7 Syarat lulus uji

Contoh dinyatakan lulus uji apabila memenuhi persyaratan mutu sesuai pasal 4 Tabel 1.

## 8 Pengemasan

Produk tepung terigu dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 9 Penandaan

Syarat penandaan produk tepung terigu sebagai bahan makanan harus diberi label. Keterangan pada label sekurang-kurangnya harus mencantumkan:

- Nama produk
- Berat bersih
- Nama dan alamat produsen
- Daftar bahan yang digunakan
- Kadaluwarsa.





## **Lampiran A**

(normatif)

### **Cara uji parameter produk tepung terigu sebagai bahan makanan**

#### **A.1 Keadaan produk**

##### **A.1.1 Bentuk**

###### **A.1.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji secara visual.

###### **A.1.1.2 Cara kerja**

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui bentuk contoh dengan meraba contoh uji.

###### **A.1.1.3 Cara menyatakan hasil**

- Apabila teraba serbuk, maka contoh uji tersebut mempunyai bentuk "serbuk".
- Apabila teraba selain serbuk, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

##### **A.1.2 Bau**

###### **A.1.2.1 Prinsip**

Analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

###### **A.1.2.2 Cara kerja**

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih dan tidak berbau.
- Lakukan penciuman terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui baunya (jarak hidung dengan contoh uji kira-kira 1/2 cm).

###### **A.1.2.3 Cara menyatakan hasil**

- Apabila tercium bau khas berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang normal.
- Apabila terdeteksi bau asing selain bau khas contoh uji, berarti contoh uji tersebut mempunyai bau yang menyimpang.

##### **A.1.3 Warna**

###### **A.1.3.1 Prinsip**

Analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan terhadap warna.



**A.1.3.2 Cara kerja**

- Taburkan contoh uji kira-kira 1 sendok makan pada wadah yang bersih.
- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui warna (jarak mata dengan contoh uji kira-kira 25 cm).

**A.1.3.3 Cara menyatakan hasil**

- Apabila terlihat warna putih khas terigu berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang normal.
- Apabila terdeteksi warna selain warna khas contoh uji; berarti contoh uji tersebut mempunyai warna yang menyimpang.

**A.2 Benda asing****A.2.1 Prinsip**

Contoh uji diamati secara organoleptik dengan indera penglihatan.

**A.2.2 Cara kerja**

- Periksa isi contoh secara organoleptik apakah mengandung benda lain selain tepung terigu misalnya kulit tanaman selain gandum, tanah, pasir dan batu-batuan.
- Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui adanya benda asing tersebut.

**A.2.3 Cara menyatakan hasil**

- Apabila tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada."
- Apabila terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

**A.3 Serangga dalam semua bentuk stadium dan potongan-potongan yang tampak (ulat, kepompong, serangga atau potongan serangga)****A.3.1 Prinsip**

Contoh uji diamati secara visual dengan menggunakan kaca pembesar.

**A.3.2 Peralatan**

- Gelas piala 250 ml
- Corong Buchner
- Kertas saring
- Kaca pembesar/ Mikroskop
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g

**A.3.3 Pereaksi**

- Kloroform( $\text{CHCl}_3$ )
- Tetra ( $\text{CCl}_4$ )



**A.3.4 Cara kerja**

- Timbang 50 g contoh ke dalam piala gelas 250 ml.
- Tambah  $\text{CHCl}_3$  sampai 1 cm di atas permukaan contoh, biarkan mengendap minimal selama 30 menit.
- Aduk bagian yang mengambang di atas permukaan lapisan beberapa kali.
- Tuangkan  $\text{CHCl}_3$  dan bagian yang mengambang ke dalam corong Buchner (hati-hati jangan sampai endapan yang dibagian bawah terbawa).
- Tambah  $\text{CCl}_4$  sebanyak volume  $\text{CHCl}_3$  dan bagian yang mengambang tertinggal dalam gelas piala.
- Biarkan mengendap lagi dan tuangkan lagi seperti di atas.
- Pengendap tuangan diulangi dengan campuran  $\text{CHCl}_3$  dan  $\text{CCl}_4$  sampai bagian yang mengambang tinggal sedikit (hati-hati jangan sampai bagian serangga yang ada ikut terbuang).
- Cuci endapan dalam gelas piala dengan  $\text{CHCl}_3$  atau  $\text{CCl}_4$  melalui kertas saring,
- Amati kertas saring menggunakan kaca pembesar/mikroskop

**A.3.5 Cara menyatakan hasil**

Hasil uji dinyatakan "tidak ada" apabila tidak nampak serangga dalam bentuk stadium dan bentuk potongannya (ulat, kepompong, serangga atau potongan-potongan serangga) Apabila terlihat maka hasil uji dinyatakan sesuai dengan hasil pengamatan.

**A.4 Kehalusan****A.4.1 Prinsip**

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh dengan menggunakan ayakan ukuran 212  $\mu\text{m}$ .

**A.4.2 Peralatan**

- Alat penggoyang ayakan;
- Ayakan dan piring/penampung 8 inchi, 212  $\mu\text{m}$  (mesh 70);
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 g.

**A.4.3 Cara kerja**

- Timbang 50 g  $\pm$  0,1g contoh, masukkan ke dalam ayakan yang dipasang pada alat penggoyang, dan goyangkan selama 5 menit ( $W_2$ ).
- Timbang bagian yang tertinggal dalam ayakan ( $W_1$ ).

**A.4.4 Perhitungan**

$$\text{Kehalusan} = 100 \times \left( \frac{W_1}{W_2} \times 100 \right)$$

dengan:

$W_1$  adalah berat bagian yang tertinggal dalam ayakan, (g);

$W_2$  adalah berat contoh, (g).



## A.5 Kadar Air

### A.5.1 Prinsip

Kehilangan berat yang terjadi pada pemanasan dalam oven dengan suhu 130 °C selama 1 jam.

### A.5.2 Peralatan

- Eksikator yang berisi desika
- Botol timbang alumunium dengan penutup Ø 5 cm, tinggi 3 cm
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1°C
- Neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg

### A.5.3 Cara kerja

- Panaskan botol timbang beserta tutupnya dengan oven pada suhu 130 °C ±3 °C selama satu jam, dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan ditimbang.
- Timbang 2 g contoh ke dalam botol timbang (W) ;
- Panaskan botol timbang dalam keadaan terbuka dalam oven pada suhu 130 °C ±3 °C selama satu jam (satu jam setelah suhu oven 130 °C);
- Tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, kemudian pindahkan kedalam eksikator, dinginkan selama 30 menit dan ditimbang (W<sub>1</sub>);
- Lakukan duplo;
- Hitung kadar air dalam contoh.

### A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1}{W} \times 100\%$$

dengan:

W<sub>1</sub> adalah kehilangan berat/berat yang menguap (g);

W adalah berat contoh (g).

### A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (*RSD*) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

## A.6 Kadar Abu

### A.6.1 Prinsip

Pengabuan contoh dalam tanur pada suhu 550°C zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO<sub>2</sub>, sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai kadar abu.

### A.6.2 Peralatan

- Eksikator yang berisi desikan
- Cawan porselin, kuarsa atau platina dengan volume 30 sampai 50 ml
- Tanur listrik, terkalibrasi dengan ketelitian 1°C
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.



**A.6.3 Cara kerja**

- Pijarkan cawan di dalam tanur listrik pada suhu  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , yang sebelumnya dipanaskan dahulu pada penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil selama 1 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 1 jam, kemudian timbang ( $W_1$ ).
- Timbang 3 g – 5 g contoh ( $W$ ).
- Arangkan di atas penangas listrik/Bunsen dengan nyala api kecil.
- Abukan dalam tanur pada suhu  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai putih atau kelabu selama 5-8 jam.
- Dinginkan dalam eksikator selama 30 menit dan timbang ( $W_2$ ).
- Masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu yang sama selama 1 jam, dinginkan dalam eksikator dengan waktu yang sama dan timbang.
- Ulangi seperti pada butir g sampai diperoleh bobot tetap (selisih penimbangan yang terakhir dan yang sebelumnya maksimum 1 mg ( $W_2$ )).
- Lakukan duplo.
- Hitung kadar abu dalam contoh.

**A.6.4 Perhitungan**

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

dengan;

$W$  adalah bobot contoh (g),

$W_1$  adalah bobot cawan kosong (g),

$W_2$  adalah bobot cawan kosong dan abu (g).

**A.6.5 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau *RSD* lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

**A.7 Kadar protein (Nx5,7)****A.7.1 Prinsip**

Senyawa protein didistruksi dengan asam sulfat dan katalis selen menjadi amonium sulfat yang diuraikan menjadi amoniak pada saat destilasi menggunakan NaOH. Amoniak yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan amonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam.

**A.7.2 Perekasi**

- Campuran katalis selen p.a
- Indikator campuran *bromocresol green* (BCG) + merah metil (MM)  
Timbang 0,15 g (BCG) dan 0,10 g MM, dilarutkan dalam 250 ml etanol 95 %.
- Larutan asam borat  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2 %  
Larutkan 60 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dalam 3000 ml air suling, pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan HCl 0,05 N  
Encerkan 4,20 ml HCl pekat dengan air suling menjadi 1000 ml.
- Larutan NaOH 30 %  
Larutkan 600 g hablur NaOH ke dalam 2000 ml air suling, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat



- g. Larutan indikator *fenolftalein* (PP) 1 %  
Larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.

### A.7.3 Peralatan

- Labu Kjeldahl 100 ml
- Distilator dan kelengkapannya
- Pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0.1 mg
- Buret 10 ml terkalibrasi
- Batu didih.

### A.7.4 Cara kerja

- Timbang 0,5 g - 1 g contoh, masukkan ke dalam labu Kjeldahl.
- Tambahkan 1 g campuran katalis selen dan 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.
- Panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisap asap.
- Biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya.
- Tambahkan 15 ml atau lebih larutan NaOH 30 % sampai berlebih (periksa dengan indikator PP dimana campuran diharapkan menjadi basa).
- Sulingkan selama 5 - 10 menit atau saat larutan distilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung distilat adalah 50 ml larutan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2 % yang telah diberikan beberapa tetes campuran indikator BCG + MM.
- Bilas ujung pendingin dengan air suling.
- Titar larutan campuran distilat dengan larutan HCl 0,05 N.
- Kerjakan penetapan blanko.

### A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 5,7 \times 100\%}{W}$$

dengan:

- V1 adalah volume HCl 0.05N untuk titrasi contoh (ml),  
 V2 adalah volume HCl 0.05N untuk titrasi blanko (ml),  
 N adalah Normalitas larutan HCl,  
 W adalah berat contoh (mg),  
 14.008 adalah Bobot atom nitrogen,  
 5,7 adalah faktor protein untuk tepung terigu.

### A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5% atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.



## A.8 Keasaman

### A.8.1 Prinsip

Lemak dari hasil ekstraksi contoh dilarutkan pelarut organik yang dilanjutkan dengan penitaran menggunakan KOH.

### A.8.2 Peralatan

- Buret 10 ml, terkalibrasi
- Erlenmeyer asah 250 ml
- Alat ekstraksi lemak
- Gelas ukur 100ml
- Penangas air
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

### A.8.3 Pereaksi

- Larutan toluena-alkohol *fenofthalein* (PP) 0,02%  
Tambahkan 0,4 gram PP ke dalam campuran 1 liter toluene dan 1 liter alkohol.
- Larutan indikator PP 0,04%  
tambahkan 0,4 g PP ke dalam satu liter alkohol.
- Petroleum-eter 40-60
- Larutan  $\text{KMnO}_4$  0,01%
- Larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,5 %
- Larutan baku KOH alkohol 0,0178 N (bebas karbonat)
  - Larutkan 1 g KOH dalam 20 ml air suling bebas  $\text{CO}_2$ , kemudian encerkan sampai 1 liter dengan alkohol 95 %, kocok hingga homogen dan simpan dalam botol coklat bertutup karet (biarkan semalam sebelum digunakan).
  - Standardisasi larutan titar KOH alkohol 0,0178 N dengan menggunakan kalium hidrogen ftalat.
  - Keringkan kalium hidrogen ftalat dalam oven pada suhu 120 °C selama 2 jam, kemudian dinginkan dalam eksikator.
  - Timbang  $0,4 \pm 0,02$  g kalium hidrogen ftalat, masukkan ke dalam labu ukur 100 ml, larutkan dengan air suling dan impitkan.
  - Pipet 10 ml larutan tersebut ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 50 ml air suling dan beberapa tetes PP.
  - Titar dengan larutan baku KOH alkohol hingga timbul warna merah muda (merah jambu) yang stabil.
  - Hitung normalitas KOH alkohol.

$$\text{Normalitas KOH} = \frac{\text{bobot kalium hidrogen ftalat}}{\text{ml KOH} \times 0,20444 \text{ g}}$$

### A.8.4 Cara kerja

- Ekstrak ( $10 \pm 0,01$ ) g contoh dengan pelarut petroleum eter 40-60 selama 16 jam di atas alat Ekstraksi lemak.
- Uapkan di atas penangas air sampai pelarut menguap semuanya dan tertinggal residu lemak .
- Larutkan residu lemak dengan 50 ml larutan toluena-alkohol PP.
- Titar dengan KOH sampai warna merah jambu atau larutan kuning menjadi sindur merah jambu. Jika terjadi emulsi selama penitaran, tambahkan lagi 50 ml larutan toluena-alkohol PP. Titik akhir harus sebanding dengan warna larutan yang dibuat dari



penambahan 2,5 ml larutan  $\text{KMnO}_4$  0,01% pada 50 ml larutan  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,5 % (tambahkan beberapa tetes  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,5 % pada 50 ml air, kemudian tambahkan 5 ml larutan  $\text{KMnO}_4$  0,01 %, dan dicampur dalam keadaan selalu baru).

- e) Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi yang sama seperti untuk contoh.

### A.8.5 Perhitungan

Keasaman lemak dihitung sebagai mg KOH yang dipergunakan untuk menetralkan asam lemak bebas dari 100 g contoh.

$$\text{Keasaman lemak} = (V - V_1) \times 10$$

dengan;

V adalah volume KOH yang diperlukan dalam penitrasi contoh (ml),

$V_1$  adalah volume penitrasi blanko (ml).

## A.9 *Falling number*

### A.9.1 Prinsip

Mengukur aktifitas enzim  $\alpha$ - amylase dalam contoh tepung terigu dengan menggunakan alat *falling number*.

### A.9.2 Peralatan

- Alat *falling number*
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,01 g
- Pipet volume 25 ml terkalibrasi

### A.9.3 Pereaksi

Air suling

### A.9.4 Cara kerja

- Nyalakan alat *falling number* sesuai petunjuk kerja alat.
- Tambahkan 25 ml air suling ke dalam dua tabung viscometer.
- Timbang dua contoh(duplo) masing-masing  $7,00 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ , kemudian masukkan dalam tabung viscometer.
- Baca nilai *falling number* pada *counter* sebagai total waktu (detik).

### A.9.5 Perhitungan

Nilai *falling number* (FN) tidak boleh untuk perhitungan komposisi campuran tepung secara langsung. FN mempunyai hubungan kurva linier dengan aktifitas enzim  $\alpha$  – amylase.

$$\text{Falling Number (Kadar air 14\%)} = \frac{\text{FN contoh} (100 - 14)}{(100 - M)}$$

dengan:

M adalah kadar air dari contoh.



### A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil *falling number* atau maksimal 2.5% dari deviasi (*RSD*). Jika kisaran lebih besar dari 5% atau *RSD* lebih besar dari 2.5 % analisis harus diulang kembali.

## A.10 Besi (Metode Spektrometer Serapan Atom, SSA)

### A.10.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan Fe. Larutan Fe ditetapkan dengan metode SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.

### A.10.2 Pereaksi

- HCl 5 N  
Encerkan 415 ml HCl 37%, Bj 1,19, kedalam labu ukur satu liter impitkan dan kocok.
- HNO<sub>3</sub> 1 N  
Larutkan 350 ml HNO<sub>3</sub> 65%, Bj 1,4 kedalam labu ukur satu liter impitkan dan kocok.
- HNO<sub>3</sub> pekat (65%, BJ 1,4)
- Larutan baku Fe 1000 mg/l  
Encerkan larutan baku Fe (Titrisol) ke dalam labu ukur satu liter dengan HCl 5N / HNO<sub>3</sub> 1 N, impitkan dan kocok. Simpan dalam botol pereaksi.
- Larutan baku Fe 50 mg/l  
Pipet 5 ml larutan baku Fe ke dalam labu ukur 100 ml, impitkan dan kocok.
- Larutan deret baku kerja Fe (0,4; 1; 3; 4; 6 dan 8 mg/l).  
Pipet larutan baku Fe 50 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, masing – masing 0,4 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 4,0ml; 6,0 ml dan 8,0 ml menggunakan pipet ukur 10 ml atau buret 10 ml, tambahkan 10 ml HCl 5 N/10 ml HNO<sub>3</sub> 1 N ke dalam masing-masing labu tersebut, impitkan dan kocok.

### A.10.3 Peralatan

- Pipet volumetrik 1 ml, 2 ml, 5 ml, dan 10 ml atau buret 10 ml dengan ketelitian 0,05 ml .
- Labu ukur 25, 50, 100 ml dan 1 l .
- Cawan kuarsa/porselin/platina kapasitas 30 - 50 ml .
- Tanur listrik terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C.
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Fe.
- Gelas piala 50 - 100 ml.
- Tabung plastik/tabung kaca.
- Microwave dan tabung vessel.

### A.10.4 Cara kerja

#### A.10.4.1 Cara pengabuan kering

- Timbang contoh sebanyak 2 g – 3 g dalam cawan.
- Arangkan diatas penangas listrik atau nyala api kecil, kemudian abukan dalam tanur listrik pada suhu (550 ± 10) °C sampai putih atau kelabu.
- Larutkan abu dengan 10 ml HCl 5 N atau HNO<sub>3</sub> 1 N (panaskan diatas penangas listrik hingga abu larut sempurna.
- Masukkan ke dalam labu ukur 50 ml, bilas cawan hingga bersih, kemudian impitkan dan kocok.
- Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.



- f. Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- g. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu x sebagai konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ).
- h. Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- i. Hitung kandungan Fe dalam contoh.

#### A.10.4.2 Cara pengabuan basah

- a. Timbang contoh sebanyak 0,5 g dalam tabung plastik/kaca/dalam gelas piala dan tambahkan 5 ml  $\text{HNO}_3$  pekat (65%, Bj 1,4).
- b. Panaskan dalam penangas air pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 1 jam kemudian didinginkan.
- c. Masukkan ke dalam labu ukur 25 ml sambil disaring, kemudian impitkan dan kocok.
- d. Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.
- e. Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- f. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu x sebagai konsentrasi (dalam  $\mu\text{g/ml}$ ).
- g. Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- h. Hitung kandungan Fe dalam contoh.

#### A.10.4.3 Cara destruksi *microwave*

- a. Timbang contoh sebanyak 0,5 g dalam tabung *vesse*/tertutup dan tambahkan 5 ml  $\text{HNO}_3$  pekat (65%, Bj 1,4).
- b. Masukkan tabung yang sudah dikencangkan ke dalam alat *microwave*.
- c. Panaskan contoh dengan *microwave digester* sesuai program kerja alat untuk tepung terigu sampai sempurna, kemudian didinginkan.
- d. Masukkan ke dalam labu ukur 25 ml, kemudian impitkan dan kocok.
- e. Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh.
- f. Baca absorben masing-masing larutan baku kerja Fe, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 248,3 nm.
- g. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu x sebagai konsentrasi (dalam  $\mu\text{g/ml}$ ).
- h. Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi;
- i. Hitung kandungan Fe dalam contoh

#### A.10.5 Perhitungan

$$\text{Kadar besi (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah  $\mu\text{g/ml}$  dari kurva kalibrasi larutan deret baku Fe;

W adalah berat contoh (g).

#### A.10.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (*RSD*) maksimal 7 %. Jika *RSD* lebih besar dari 7%, maka analisis harus diulang kembali.



**A.11 Seng (Zn)****A.11.1 Prinsip**

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering, dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Kemudian absorben dibaca menggunakan alat SSA.

**A.11.2 Peralatan**

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- Cawan porselen/platina/kuarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml.
- Penangas listrik.
- Tanur terkalibrasi suhu 500 °C dengan ketelitian 1°C.
- SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Zn.
- Pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml.
- Labu ukur 50 ml, 100 ml dan 1000 ml, terkalibrasi.
- Gelas ukur kapasitas 10 ml.
- Penangas air.

**A.11.3 Pereaksi**

- Larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N (larutan 7 ml  $\text{HNO}_3$  65%, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- Larutan  $\text{HCl}$  6N (larutkan 500 ml  $\text{HCl}$  37%, encerkan menjadi 1 l dengan air suling)
- Larutan  $\text{HNO}_3$  pekat (65%, Bj 1,4)
- Larutan  $\text{HCl}$  pekat (37%, Bj 1,19)
- Kertas Whatman No. 41
- Larutan baku Zn  
Sediaan larutan baku Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Larutkan 1,000 g Zn dalam 7 ml  $\text{HNO}_3$  pekat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Atau bisa digunakan larutan baku kerja Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$  siap pakai.
- Larutan baku kerja  
Pipet 10,0 ml larutan baku Zn 1000  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam labu ukur 100 ml. Encerkan dan tepatkan volume dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N dan kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  Zn. Pipet masing-masing 0,25; 0,5; 1; 2 dan 4 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan tepatkan volume dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N. Larutan akhir baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 dan 4,0  $\mu\text{g/ml}$  Zn.

**A.11.4 Cara kerja**

- Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa.
- Arangkan cawan berisi contoh di atas penangas listrik (untuk mempercepat pengabuan bila perlu tambahkan 10 ml  $\text{MgNO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  10% dalam alkohol), kemudian panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi.
- Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500 °C sampai abu berwarna putih bebas dari karbon.
- Apabila abu masih terdapat sisa karbon, ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan abu dengan beberapa tetes air diikuti penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat, tetes demi tetes kira-kira 0,5 ml - 3 ml.
- Keringkan cawan di atas penangas listrik, dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500°C, lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat, bisa diulangi bila abu masih berwarna keabu-abuan.
- Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml  $\text{HCl}$  6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit.
- Saring larutan melalui kertas saring whatman no.41 ke dalam labu ukur 50 ml.



- h. Cuci residu dengan 5 ml  $\text{HNO}_3$  0,1 N, saring dan satukan filtrat ke dalam labu ukur 50 ml. Encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan larutan  $\text{HNO}_3$  0,1 N
- i. Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh.
- j. Baca absorben larutan baku kerja, larutan contoh dan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 213,9 nm.
- k. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorben dan sumbu x sebagai konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ).
- l. Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- m. Hitung kandungan Zn dalam contoh.

#### A.11.5 Perhitungan

$$\text{Kadar n (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah  $\mu\text{g/ml}$  dari kurva kalibrasi larutan deret Zn;

W adalah berat contoh (g).

#### A.11.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (*RSD*) maksimal 7%. Jika *RSD* lebih besar dari 7%, maka analisis harus diulang kembali.

### A.12 Vitamin B1 (thiamin) dan vitamin B2 (riboflavin)

#### A.12.1 Prinsip

Ekstraksi vitamin dengan menggunakan asam klorida pada pH 4,5 yang kemudian dilakukan pemisahan melalui kolom jenis C18 dengan fase methanol-air yang mengandung campuran natrium heksan sulfonat dengan natrium heptan sulfonat atau campuran natrium heptan sulfonat dengan natrium pentan sulfonat yang diperiksa pada panjang gelombang 254 nm.

#### A.12.2 Peralatan

- a) HPLC yang dilengkapi dengan integrator  
 Detector UV, panjang gelombang 254 nm  
 Kolom : mikrobondapak C18 panjang 30 cm, diameter 3,9 mm  
 Kecepatan alir : 1,0 ml / menit  
 Penyaring : whatman No. 42 dan Millipore HV 0,15  $\mu\text{m}$   
 Volume injek : 20  $\mu\text{l}$
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- c) Penangas air
- d) Labu ukur (amber glass)
- e) Labu Erlenmeyer (amber glass)
- f) Pipet ukur (amber glass)
- g) Pipet volume (amber glass)
- h) Tabung kimia (amber glass)
- i) Spatula.



**A.12.3 Pereaksi**

- a) larutan HCl 0.1N
  - masukkan air suling  $\pm$  250 ml ke dalam labu ukur 1000 ml.
  - pipet 8,33 ml HCl pekat, masukkan dalam labu ukur.
  - encerkan hingga tanda tera dengan air suling.
  - kocok sampai homogen.
- b) Larutan natrium asetat 2 M
  - timbang 42,015 g natrium asetat.
  - masukkan dalam labu ukur 250 ml.
  - tambahkan 50 ml air suling, kocok sampai larut.
  - kocok hingga homogen.
- c) Standar vitamin B1
- d) Standar vitamin B2

**A.12.4 Persiapan larutan standar vitamin B1 dan B2 100  $\mu$ g/ml**

- a) Timbang masing-masing standar dengan teliti 0,01 g.
- b) Masukkan pada labu Erlenmeyer 100 ml.
- c) Tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok.
- d) Panaskan pada suhu 95 °C -100 °C pada penangas air selama 30 menit.
- e) Dinginkan pada suhu kamar.
- f) Atur pH larutan campuran standar hingga mencapai 4.5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M menggunakan alat pH-meter atau kertas penunjuk pH.
- g) Masukkan larutan campuran standar pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling, kocok sampai homogen.
- h) Pipet 10 ml larutan standar vitamin B1 dan B2 100  $\mu$ g/ml ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan sampai tanda garis dengan air suling, kocok sampai homogen.
- i) Saring dengan kertas saring whatman No. 40
- j) Hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C18.
- k) Larutan disuntikkan pada HPLC.

**A.12.5 Persiapan larutan contoh**

- a) Timbang 5 g – 7 g contoh dengan teliti yang sebelumnya telah dihaluskan.
- b) Masukkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml.
- c) Tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok.
- d) Panaskan pada penangas air dengan suhu 95 °C - 100 °C selama 30 menit.
- e) Dinginkan pada suhu kamar.
- f) Atur pH larutan contoh hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M menggunakan alat pH-meter atau kertas petunjuk pH.
- g) Masukkan larutan contoh pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling.
- h) Pipet 1 ml larutan standar ke dalam labu ukur 100 ml, secara kuantitatif impitkan sampai tanda garis dan kocok
- i) Saring dengan kertas whatman No. 42.
- j) Hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C<sub>18</sub>.
- k) Larutan siap untuk disuntikkan pada HPLC.
- l) Kerjakan juga blanko dengan pengerjaan seperti di atas.

**A.12.6 Persiapan larutan fase gerak**

- a) Larutkan (0,188 g natrium heksan sulfonat dengan 0,202 g natrium heptan sulfonat atau 0,261 g natrium pentan sulfonat dan 0,202 g natrium heptan sulfonat) dengan campuran



methanol: asam asetat: air (32 :1 : 67) ke dalam labu ukur 500 ml, impitkan dan kocok sampai homogen.

- b) Larutan disaring dalam penyaring Millipore 0,45 µm.
- c) Larutan fase gerak siap dipakai untuk HPLC.

#### A.12.7 Analisis contoh dengan HPLC

- a) Siapkan alat HPLC dengan kondisi seperti diatas.
- b) Periksa *base line* dengan menyuntikan blanko.
- c) Suntikan larutan standar.
- d) Suntikan contoh.

#### A.12.8 Perhitungan

$$C_{sp} = \frac{\frac{A_{sp}}{A_{st}} \times C_{st} \times t}{W}$$

dengan:

- F adalah faktor pengenceran,
- C<sub>sp</sub> adalah konsentrasi contoh (mg/kg),
- A<sub>sp</sub> adalah area contoh,
- A<sub>st</sub> adalah area standar,
- C<sub>st</sub> adalah konsentrasi standar (µg/ml),
- W adalah bobot contoh (g).

### A.13 Asam folat

#### A.13.1 Prinsip

Penetapan asam folat dengan membandingkan asam folat dari contoh terhadap asam folat standar dengan spektrometer pada panjang gelombang 575 nm.

#### A.13.2 Peralatan

- a. Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- b. Autoklaf
- c. Inkubator
- d. Lemari pendingin
- e. Spektrometer
- f. Labu ukur 100 ml, 250 ml, dan 500 ml yang terbuat dari kaca berwarna coklat (amber glass)
- g. Penutup asah terbuat dari kaca berwarna coklat (amber glass)
- h. Tabung reaksi (180 x 18 ml)
- i. Penutup cap – 0 – test
- j. Pipet ukur
- k. Sengkelit (jarum ose)
- l. Kuvet
- m. Sendok
- n. Tabung *centrifuge*
- o. Ball pipet
- p. Botol contoh yang berwarna coklat
- q. Mesin *centrifuge*
- r. Pipettor
- s. Tips pipet



- t. Gelas piala
- u. Corong
- v. Spatula
- w. Vortex/mixer
- x. Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C

### A.13.3 Pembenihan dan pereaksi

- a. Media biakan agar / Difco *lactobacilli* agar AOAC “
- b. Media biakan cair/ Difco *lactobacilli* broth AOAC”
- c. Larutan media induk "Difco folic medium AOAC"(No. 0967-15)
- d. Biakan *Streptococcus faecalis* ATCC. No. 8043
- e. NaCl 0,9 %
- f. Larutan baku asam folat
- g. NH<sub>4</sub>OH 0,1 N
- h. Alkohol
- i. HCl 0,1 N
- j. NH<sub>4</sub>OH 0,01 N
- k. Air suling

### A.13.4 Cara kerja

#### A.13.4.1 Pengembangan *Streptococcus faecalis*

##### a. Stok biakan uji organisma

1. Persiapkan biakan uji organisma kedalam lebih dari satu tabung media biakan agar.
2. Inkubasikan selama 6-24 jam pada suhu 30°C dan 40 °C ± 0,5°C, dan terakhir simpan pada 10 °C. Sebelum digunakan pengujian, pindahkan biakan setiap 1-2 minggu sekali.
3. Persiapkan biakan yang segar maksimal berumur 1 minggu dan jangan gunakan biakan jika lebih dari 1 minggu.

##### b. Biakan organisme uji

1. Pindahkan biakan stok *Streptococcus faecalis* ATCC. No. 8043 ke dalam tabung steril yang berisi 10 ml media biakan cair.
2. Inkubasikan selama 6-24 jam pada suhu 30°C dan 40 °C ± 0,5°C.
3. Di bawah kondisi aseptik, biakan disentrifuge.
4. Hasil sentrifuge biakan, bagian atasnya dibuang .
5. Bilas dengan 3-10 ml larutan NaCl 0,9% steril .

##### c. Persiapan contoh

1. Tempatkan contoh didalam wadah dan tambahkan air 10 kali atau lebih dari berat kering contoh (hasil larutan harus mengandung sama dengan atau kurang dari 1,0 mg asam folat / ml).
2. Jika contoh tidak larut, tambahkan lagi larutan dengan menambahkan NH<sub>4</sub>OH 0,1N.
3. Contoh diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121-123 °C dan dinginkan. Jika ada penggumpalan, kocok sampai larut.
4. Tambahkan air sampai batas volume.
5. Saring contoh atau disentrifuge.
6. Ambil bagian cairan yang jernih, tempatkan dalam labu ukur dan tambahkan air suling.
7. Atur pH sampai menunjukan pH 6,8.
8. Tambahkan lagi dengan air suling sampai batas volume sehingga mengandung asam folat sama dengan atau kurang dari 1,0 mg asam folat / ml.



**d. Persiapan larutan asam folat standar**

1. Larutan baku 100 µg/ml
2. Ditimbang sebanyak 50-60 mg asam folat dan simpan didalam desikator yang berisi  $P_2O_5$  dalam, ditambahkan 30 ml NaOH 0,01 M dan tambahkan lagi 300 ml air suling. Atur sampai pH menunjukkan 7 – 8 dengan HCl, tambahkan lagi air suling sampai konsentrasi asam folat menjadi 100 µg/ml, simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C
- 2 Larutan intermediat I 1 µg/ml  
10 ml larutan 100 µg/ml asam folat, ditambahkan 500 ml air suling, atur pH sampai menunjukkan 7-8, tambahkan lagi air suling sampai 1 lt. Simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C
3. Larutan intermediat II 100 ng/ml  
100 ml larutan 1 µg/ml asam folat ditambahkan 500 ml air suling, atur pH sampai menunjukkan 7-8, tambahkan lagi air suling sampai 1 lt. Simpan dalam kondisi gelap pada suhu 10 °C
4. Larutan baku kerja  
Larutan intermediate II ditambahkan ke dalam deretan seri larutan standar (Tabel 4) Tambahkan air sehingga volume masing-masing deret standar 5 ml (konsentrasi ini biasanya mengandung 1 – 4 ng asam folat/ml. Siapkan standar yang baru untuk masing-masing pengujian

**e. Persiapan larutan induk media asam folat**

1. siapkan larutan secukupnya sesuai dengan yang diperlukan.
2. siapkan larutan sesuai aturan seperti yang tertera dilabel media.

**f. Analisis**

1. Siapkan satu seri larutan asam folat standar seperti di bawah ini

**Tabel 4 Larutan asam folat standar**

Satuan dalam mililiter

No. tabung							
	1	2	3	4	5	6	7
Larutan standar	0.0	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Air suling	5	5	4	3	2	1	0
Larutan induk media	5	5	5	5	5	5	5

Siapkan dua tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup cap -0-test

**CATATAN** Tabung No.1 tidak ditambahkan biakan dan Tabung No.2 ditambahkan biakan.

2. Siapkan satu seri larutan contoh seperti di bawah ini

**Tabel 5 Larutan contoh untuk uji asam folat**

Satuan dalam mililiter

No. tabung				
	1	2	3	4
Larutan contoh	1	2	3	4
Air suling	4	3	2	1
Larutan induk media	5	5	5	5



3. Siapkan 2 (dua) tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup cap-o-tes.
4. Sterilkan tabung tersebut diatas pada suhu 121<sup>0</sup>C -123 <sup>0</sup>C selama 10 menit.
5. Tambahkan dengan pipet steril/pipettor satu tetes biakan ke dalam semua tabung reaksi tersebut di atas kecuali tabung blanko yang tidak ditambahkan media.
6. Kocok tabung tabung tersebut secara perlahan-lahan sampai media tercampur merata
7. Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu 30<sup>0</sup>C dan 40 <sup>0</sup>C ± 0,50 <sup>0</sup>C untuk beberapa waktu (bila perkembangan mikroorganismanya belum sempurna maka dapat diperpanjang waktu inkubasinya).
8. Ukur dengan spektrometer transmittance larutan pada panjang gelombang 575 nm.

#### A.13.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi asam folat pada contoh (mg/kg)} = \frac{C \times F \times V \times 1000}{W}$$

dengan;

- C adalah konsentrasi yang dibaca dari kurva standar(ng/ml),  
 F adalah faktor pengenceran,  
 V adalah volume untuk melarutkan contoh (ml),  
 W adalah berat contoh yang ditimbang.(g).

#### A.14 Cemarkan logam

##### A.14.1 Penetapan cemarkan logam Pb, dan Cu

###### A.14.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering, dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Kemudian absorben dibaca menggunakan alat SSA.

###### A.14.1.2 Peralatan

- a. Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- b. Cawan porselen/platina/kuarsa dengan kapasitas 50 ml – 100 ml.
- c. Penangas listrik.
- d. Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 <sup>0</sup>C.
- e. SSA terkalibrasi dengan lampu katoda Pb, Cu dan Hg.
- f. Pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml.
- g. Labu ukur 50 ml, 100 ml dan 1000 ml, terkalibrasi.
- h. Gelas ukur kapasitas 10 ml.
- i. Penangas air.

###### A.14.1.3 Pereaksi

- a. Larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N (larutan 7 ml HNO<sub>3</sub> 65%, encerkan menjadi 1 l dengan air suling).
- b. Larutan HCl 6N (larutkan 500 ml HCl 37%, encerkan menjadi 1 l dengan air suling).
- c. Larutan standar Pb, dan Cu 1000 µg/ml
- d. Larutan HNO<sub>3</sub> pekat (65%, Bj 1,4)
- e. Larutan HCl pekat (37%, Bj 1,19)
- f. Kertas Whatman no. 41



- g. Larutan baku Cu  
Sediaan larutan baku Cu 1000 µg/ml Larutkan 1,000 g Cu dalam 7 ml HNO<sub>3</sub> pekat, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Atau bisa digunakan larutan baku kerja Cu 1000 µg/ml siap pakai.
- h. Larutan kerja baku  
Pipet 10,0 ml larutan baku 1000 µg/ml ke dalam labu ukur 100 ml. Encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N dan kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 µg/ml Cu. Pipet masing-masing 0,25; 0,5; 1; 2 dan 4 ml larutan baku kedua ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan tepatkan volume dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N. Larutan akhir baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 dan 4,0 µg/ml Cu.
- i. Larutan baku kerja Pb
- Pipet 10,0 ml larutan standar 1000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, encerkan dan tepatkan volume dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N. larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 100 µg/ml
  - Pipet masing-masing 1,2,4,6 dan 8 ml larutan standar 100 µg/ml ke dalam labu ukur 100 ml terpisah, kemudian encerkan dan tepatkan volumenya dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N. Larutan baku akhir ini memiliki konsentrasi 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 µg/ml Pb.

#### A.14.1.4 Cara kerja

- a. Timbang dengan teliti 5 g contoh dalam cawan porselen/platina/kuarsa.
- b. Tempatkan cawan berisi contoh di atas penangas listrik (untuk mempercepat pengabuan bila perlu tambahkan 10 ml MgNO<sub>3</sub> 2 H<sub>2</sub>O 10 % dalam alkohol), kemudian panaskan secara bertahap sampai contoh terbakar dan tidak berasap lagi.
- c. Lanjutkan pengabuan dalam tanur 500°C sampai abu berwarna putih bebas dari karbon
- d. Apabila abu masih terdapat sisa karbon, ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan abu dengan beberapa tetes air diikuti penambahan HNO<sub>3</sub> pekat, tetes demi tetes kira-kira 0,5 ml - 3 ml.
- e. Keringkan cawan di atas penangas listrik, dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500°C, lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO<sub>3</sub> pekat, bisa diulangi bila abu masih berwarna keabu-abuan.
- f. Larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai 3 menit.
- g. Saring larutan melalui kertas saring whatman no.41 ke dalam labu ukur 50 ml.
- h. Cuci residu dengan 5 ml HNO<sub>3</sub> 0,1 N, saring dan satukan filtrat ke dalam labu ukur 50 ml. Encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan larutan HNO<sub>3</sub> 0,1 N.
- i. Buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan seperti contoh.
- j. Baca absorben larutan baku kerja, larutan contoh dan larutan blanko dengan alat SSA pada panjang gelombang 324 nm untuk Cu dan Pb pada panjang gelombang 283 nm.
- k. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu x sebagai konsentrasi (dalam µg/ml). Plot hasil pembacaan contoh pada kurva kalibrasi.
- l. Hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.14.1.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Logam (mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah µg/ml dari kurva kalibrasi larutan deret baku Cu/Pb;

W adalah berat contoh (g).



## A.14.2 Penetapan cemaran logam raksa (Hg)

### A.14.2.1 Prinsip

Mereaksikan senyawa raksa dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam guna membentuk gas atomik Hg dan diikuti dengan pembacaan absorbans menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala dengan panjang gelombang 253,7 nm.

### A.14.2.2 Pereaksi

- a. Larutan pereduksi
  - Larutan  $\text{SnCl}_2$   
Campurkan 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 ml air suling. Dinginkan hingga suhu ruang, tambah 15 g NaCl, 15 g hidroksilaminsulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ , impitkan hingga 500 ml atau dapat juga digunakan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ).
  - Larutan  $\text{NaBH}_4$   
Larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dalam air suling dalam labu ukur 500 ml.
- b. Larutan pengencer  
Tambahkan 58 ml  $\text{HNO}_3$  dan 67 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ke dalam labu ukur 1 liter yang mengandung 300 – 500 ml air suling, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling, dan kocok.
- c. Larutan baku raksa
  - Larutan baku 1000 mg/l  
Larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dalam 100,0 ml air suling.
  - Larutan kerja 1 mg Hg/l  
Encerkan 1 ml larutan baku 1000 mg/l dalam 1 liter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (larutan pengencer). Larutan kerja ini harus dibuat langsung sebelum digunakan.
  - Larutan baku standar yang mempunyai konsentrasi akhir 0; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02  $\mu\text{g}$  Hg/ml.
- f.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N;
- g.  $\text{HNO}_3$  7 N;
- h. Batu didih;
- i. Campuran  $\text{HNO}_4$  :  $\text{HClO}_3$  (1:1);
- j.  $\text{H}_2\text{O}_2$
- k. Larutan molibdat 2%.

### A.14.2.3 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG")
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
- Labu ukur 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml terkalibrasi
- Penangas listrik

### A.14.2.4 Cara kerja

#### A.14.2.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh ke dalam labu destruksi, tambah 25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 N, 20 ml  $\text{HNO}_3$  7N, 1 ml larutan natrium molibdat 2% dan 5 – 6 batu didih.
- Hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit.



- Tambah 20 ml  $\text{HNO}_3$  (1:1) melalui pendingin.
- Hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit, kemudian dinginkan.
- Dengan hati-hati tambahkan 10 ml air melalui pendingin sambil labu digoyang-goyangkan.
- Didihkan lagi selama 10 menit.
- Matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 3 kali 15 ml air suling, dinginkan sampai suhu kamar.
- Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh
- Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0; 0,0025; 0,005; 0,01 dan 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Hg.
- Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat "HVG".
- Baca absorbenlarutan deret baku, larutan destruksi dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm,
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja.
- Hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.14.2.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* dengan sistim tertutup

- Timbang 0,5 - 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 4 ml  $\text{HNO}_3$  dan 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  tutup rapat dan masukkan ke dalam *microwave*. Kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat.
- Secara kuantitatif, pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 25 ml, encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Kerjakan blanko dengan pemakaian pereaksi seperti yang digunakan pada contoh.
- Siapkan deret baku dengan konsentrasi akhir 0; 0,0025; 0,005; 0,01 dan 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Hg.
- Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan deret baku, larutan destruksi, dan larutan blanko pada alat "HVG".
- Baca absorbenlarutan deret baku, larutan contoh dan larutan blanko dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu X sebagai konsentrasi dalam ppm dari pembacaan deret larutan baku kerja.
- Hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.14.2.5 Perhitungan

$$\text{Kadar Hg(mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran

b adalah  $\mu\text{g/ml}$  dari kurva kalibrasi larutan deret baku Hg

W adalah berat contoh (g).



## A.15 Cemarkaran arsen

### A.15.3.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

### A.15.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (“HVG”).
- Labu destruksi 250 ml berdasar bulat kapasitas 250 ml.
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm – 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, kemudian dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm.
- Labu ukur 25 ml, 25 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml terkalibrasi.
- Penangas listrik.

### A.15.3.3 Pereaksi

- a. Natrium boronhidrida  
Larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dalam 500 ml air suling.
- b. Asam klorida 8 M  
Encerkan 66 ml  $\text{HCl}$  37% hingga 100 ml air suling.
- c. Timah (II) klorida 10%  
Timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 ml. Tambah 100 ml  $\text{HCl}$  37%. Panaskan hingga larutan jernih. Dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan impitkan dengan air suling.
- d. Kalium iodida 20%  
Timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- e. Larutan standar induk arsen 1000 mg/l  
Larutkan 1.3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dalam sedikit  $\text{NaOH}$  20%, kemudian netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:3 (1 bagian asam: 3 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter, dan impitkan dengan air suling.
- f. Larutan baku arsen 100 mg/l  
Pipet 10 ml larutan baku induk arsen 1000 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- g. Larutan baku arsen 1 mg/l (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
Pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml, dan impitkan dengan air suling.
- h. Larutan deret standar arsen 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
Pipet 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 ml larutan baku arsen 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ke dalam labu 50 ml, dan impitkan dengan air suling (larutan harus dibuat baru).
- i.  $\text{HNO}_3$  pekat.
- j.  $\text{HClO}_4$  pekat.

### A.15.3.4 Persiapan contoh

#### A.15.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh dalam labu destruksi dan tambahkan tambah 20 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.a dan 15 ml  $\text{HNO}_3$  p.a



- Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambah lagi  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit hingga contoh berwarna coklat atau kehitaman.
- Tambah 10 ml  $\text{HClO}_4$  sedikit demi sedikit, panaskan lagi hingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangkan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  p.a)
- Pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan impitkan dengan air suling.

#### A.15.3.4.2 Pengabuan kering

- Timbang 5 g contoh dalam cawan, tambah 2.5 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan 25 ml  $\text{HNO}_3$  pekat.
- Aduk dengan sempurna dan uapkan di atas penangas listrik hingga kering.
- Arangkan dalam tanur  $500^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Basahkan dengan  $\text{HNO}_3$  p.a. Uapkan lagi dan abukan lagi selama 1 jam pada  $500^\circ\text{C}$ . sampai didapat abu berwarna putih.
- Larutkan dengan larutan  $\text{HCl}$  1:3 dan impitkan hingga 50 ml dengan air suling.

#### A.15.3.4.3 Destruksi dengan *microwave* (sistem tertutup)

- Timbang 0,5 - 1 g contoh ke dalam tabung destruksi, tambah 2 ml  $\text{HNO}_3$  dan 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tutup tabung dan masukkan ke dalam alat *microwave*.
- Kerjakan programnya sesuai dengan instruksi kerja alat.
- Setelah dingin, pindahkan secara kuantitatif larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml dan impitkan dengan air suling.

#### A.15.3.5 Cara kerja

- Siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat.
- Pipet 25 ml larutan destruksi ( dari persiapan contoh B.5.3.4.1 ; B.5.3.4.2 atau B.5.3.4.3), tambahkan 2 ml  $\text{HCl}$  8 M dan 0,1 ml  $\text{KI}$  20% kemudian biarkan minimal 2 menit.
- Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat.
- Tuangkan deret standar arsen 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05  $\mu\text{g/ml}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh.
- Baca nilai absorbentertinggi dari standar dan contoh dengan blanko sebagai koreksi.
- Buat kurva standar dengan sumbu Y sebagai absorbendan sumbu X sebagai konsentrasi .
- Hitung kandungan arsen dari contoh.

#### A.15.3.6 Perhitungan

$$\text{Kadar As(mg/kg)} = \frac{F \times b}{W}$$

dengan:

F adalah faktor pengenceran;

b adalah  $\mu\text{g/ml}$  dari kurva kalibrasi larutan deret baku As;

W adalah berat contoh (g).



**A.16 Cemaran mikroba****A.16.1 Angka lempeng total (metode *plate count*)****A.16.1.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 24 – 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**A.16.1.2 Peralatan**

- Cawan petri dari gelas / plastik (90 – 100 mm).
- Pipet ukur (1,5 ml dan 10 ml).
- Penangas air  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
- Lemari pengering  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
- Alat penghitung koloni (*colony counter*).
- Otoklaf
- Alat sterilisasi kering (oven).

**A.16.1.3 Pembenihan dan pengencer****a. *Buffered peptone water* (BPW)**

- |                               |         |
|-------------------------------|---------|
| – Peptone                     | 10 g    |
| – Natrium klorida             | 5 g     |
| – Disodium hydrogen phosphate | 3.5 g   |
| – Kalium dihidrogen phosphate | 1,5 g   |
| – Air suling                  | 1 liter |

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 ml atau 450 ml ke dalam botol (labu) 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 20 menit.

**b. Peptone 0.1 %**

- |              |         |
|--------------|---------|
| – Peptone    | 1 g     |
| – Air Suling | 1 liter |

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 ml atau 450 ml ke dalam botol (labu) 500 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu  $121 ^\circ\text{C}$  selama 20 menit.

**b. *Plate count agar* (PCA)**

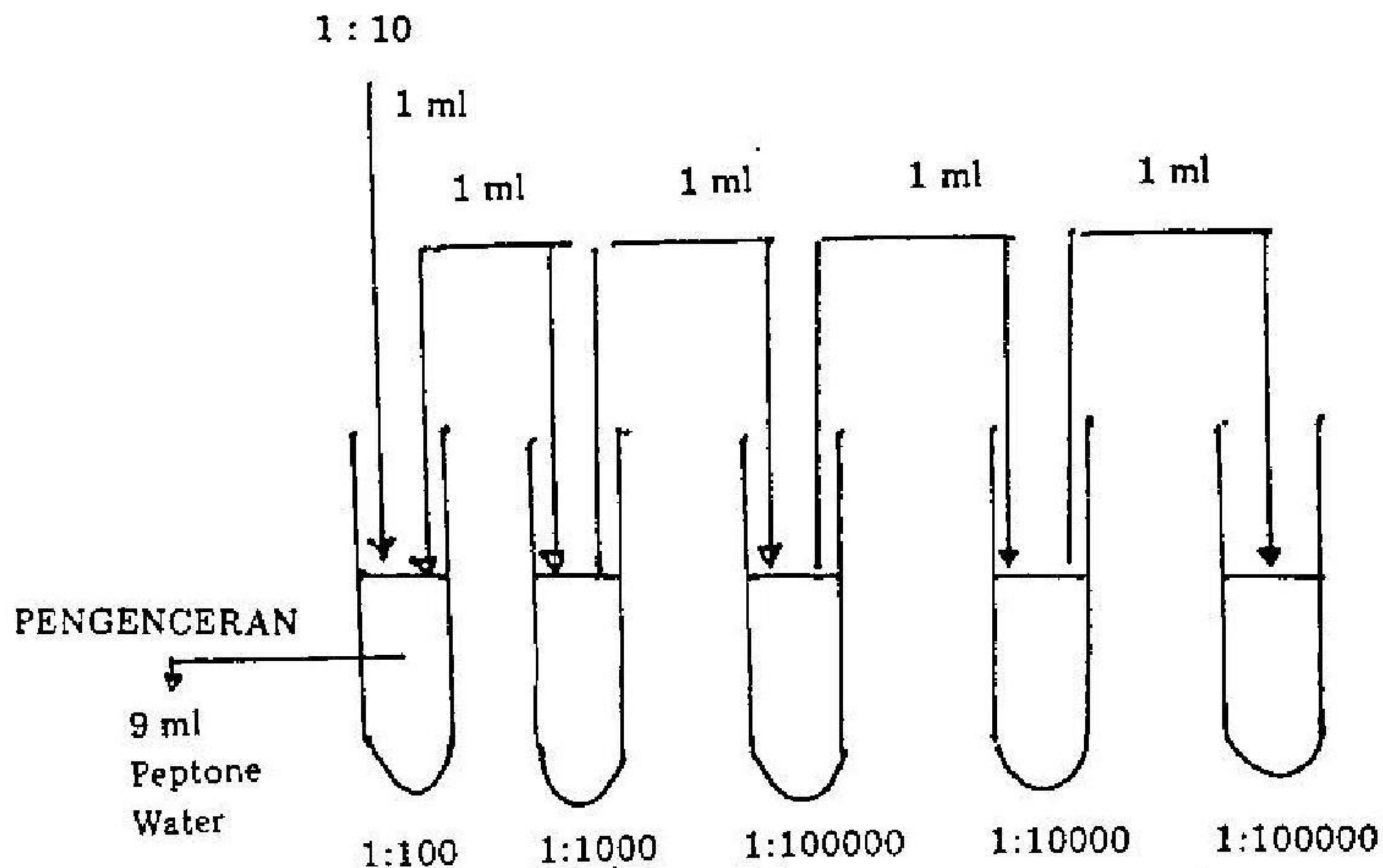
- |                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| – <i>Yeast extract</i>                | 2,5 g     |
| – <i>Pancreatic digest of Caseine</i> | 5 g       |
| – Glucose                             | 1 g       |
| – Agar                                | 15 – 20 g |
| – Air suling                          | 1 liter   |

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada  $121 ^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

**A.16.1.4 Cara kerja**

- Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar B.1.





**Gambar B.1 Metoda pengenceran**

- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran  $10^1$ –  $10^5$  ke dalam cawan petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12 – 15 ml media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram dan inkubasikan pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 24 – 48 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 – 250 koloni setelah 48 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### **A.16.1.5 Pernyataan hasil**

##### **A.16.1.5.1 Cara menghitung**

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per g.
- Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 – 250 koloni, kalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per g.



Contoh:

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$\text{ALT} = 120 + 105 + 25 [(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}] = 11904$$

$$= 12000 (1,2 \times 10^4)$$

- (3) Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$\text{ALT} = \sum C [(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]$$

dimana :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri

 $n_1$  adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung $n_2$  adalah jumlah petri dari pengenceran kedua

d adalah pengenceran pertama yang dihitung

Contoh:

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$\text{ALT} = 131 + 143 + 30 + 25 [(1 \times 2) + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 14954$$

$$= 15000 (1,5 \times 10^4)$$

- (4) Bila jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.
- a. Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan: jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh:

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan	
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 \text{ (} 6,4 \times 10^5 \text{)}$	

Jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 \text{ (} 6,5 \times 10^6 \text{)}$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 \text{ (} 5,9 \times 10^6 \text{)}$

- (5) Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 dikalikan pengenceran yang terendah .
- (6) Menghitung koloni perambat, ada 3 macam perambat pada koloni, yaitu :
- Merupakan rantai yang tidak terpisah
  - Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan
  - Perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.



Apabila terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Tetapi apabila ada satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

#### A.16.1.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

1. Bila angka ketiga lebih besar dari 5, bulatkan ke atas.  
contohnya: 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya ( $5,3 \times 10^2$ )
2. Bila angka ketiga kurang dari 5, bulatkan kebawah.  
contohnya: 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya ( $5,2 \times 10^2$ )
3. Bila angka ketiga 5, lakukan pembulatan sebagai berikut:
  - a. Bulatkan ke atas bila angka kedua merupakan angka ganjil.  
contohnya: 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya ( $5,8 \times 10^2$ )
  - d. Bulatkan ke bawah bila angka kedua merupakan angka genap  
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya ( $5,6 \times 10^2$ )

### A.16.2 E. Coli

#### A.16.2.1 Prinsip

Dengan ditandai pembentukan gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

#### A.16.2.2 Peralatan

- a. Pinggan petri gelas (15 x 100 mm) atau plastik (15 x 90 mm), steril.
- b. Pipet 1 dan 10 ml berskala;
- c. Botol pengenceran ( $\pm 20$  ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran.
- d. Lemari Pengeram (Inkubator), ( $35 \pm 1$ ) °C.
- e. Tabung reaksi (16 x 150 mm) dan tabung Durham.
- f. Rak untuk tabung reaksi.
- g. Jarum inokulasi, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm (ose).
- h. Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ( $45,5 \pm 0,2$ ) °C.

#### A.16.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a. Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth.
- b. Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %.
- c. E. C. broth.
- d. Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar.
- e. Plate Count Agar (PCA).
- f. g stain.
- g. Tryptone broth.
- h. Pereaksi Kovacs.
- i. MR - VP medium.
- j. Pereaksi Voges Proskauer.
- k. Larutan Methyl Red.
- l. Koser's Citrate Medium.



- m. Peptone Water.
- n. Pereaksi Indole.
- o. Larutan Kalium Hidroksida 40 %.
- p. Buffer fields phosfat buffered dilution water (BPBDW).

#### A.16.2.4 Cara kerja

##### A.16.2.4.1 *Presumptive test* untuk Bakteri Coliform (Uji Dugaan)

###### A.16.2.4.1.1 Persiapan contoh uji

- a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai butir A.16.1.4 bagian a.
- b. Tiga tabung lauryl sulfate tryptose broth masing - masing diinokulasi dengan 1 ml dari setiap tingkat pengenceran ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ). Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 - 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya.
- c. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama  $48 \pm 2$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .
- d. Setelah  $24 \pm 2$  jam, periksa tabung-tabung yang telah mengandung gas. Ini adalah tabung-tabung yang positif.
- e. Tabung-tabung yang negatif diinkubasikan lagi selama 24 jam.
- f. Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi  $48 \pm 2$  jam, karena ini adalah presumptive test yang positif untuk bakteri coliform.
- g. Lakukan confirmed test terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

##### A.16.2.4.2 *Confirmed test* untuk Bakteri Coliform (Uji Penegasan)

- a. Tabung LST yang positif dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan.
- c. Inkubasikan tabung-tabung BGLB 2 % ini selama  $48 \pm 2$  jam pada suhu  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ .
- d. Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel 1, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $48 \pm 2$  jam pada  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ .
- e. Laporkan sebagai APM bakteri coliform per g.

##### A.16.2.4.3 *Confirmed test* untuk *Escherichia coli*

- a. Tabung LST yang positif dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan.
- c. Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama  $48 \pm 2$  jam pada  $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ . Penangas air yang dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.
- d. Terbentuknya gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi  $48 \pm 2$  jam dianggap positif.
- e. Tabung-tabung EC yang positif dikocok hati-hati lalu dari setiap tabung digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm.
- f. Inkubasikan piringan agar L-EMB tersebut selama 18-24 jam pada suhu  $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ .
- g. Periksa piringan - piringan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam.



- h. Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia.
- i. Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 - 24 jam pada suhu 35°C. Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, E coli adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora.
- j. Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC.
- 1) Pembentukan indol
    - Inokulasi tabung tryptone broth.
    - Inkubasi selama  $24 \pm 2$  jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
    - Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 - 0,3 ml pereaksi Kovacs.
    - Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
  - 2) Reaksi Voges Proskauer dan Methyl red
    - Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama  $48 \pm 2$  jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
    - Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
    - Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
    - Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
    - Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
    - Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
    - Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
  - 3) Penggunaan Sitrat
    - Dengan hati - hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
    - Inkubasikan selama 96 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .
    - Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).
  - 4) Pembentukan gas dari Lactose
 

Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 35°C. Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

#### A.16.2.5.4 Klasifikasi dan laporan

- Reaksi biokimia E. coli pada uji IMVIC

**Tabel 6 Reaksi biokimia E. coli pada uji IMVIC**

Jasad	Indol	Methyl red	Voges Proskauer	Citrate
Escherichia Coli				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai E. coli apabila IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan g menunjukkan g negatif bentuk batang tidak bersepora atau coccus yang membentuk Gas dalam kaldu LST pada waktu inkubasi  $48 \pm 2$  jam.
- Hitunglah APM E. coli dengan menggunakan Tabel APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung E coli.



**Tabel 7 APM/MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (1,0; 0,1, dan 0,01g/ ml contoh)**

Tabung yang positif			APM/MPN	Tabung yang positif			MPN
1	0,1	0,01		1	0,1	0,01	
0	0	0	0,000	2	2	0	2,11
0	0	1	0,301	2	2	1	2,76
0	1	0	0,305	2	2	2	3,48
0	1	1	0,611	2	3	0	2,86
0	2	0	0,619	2	3	1	3,60
0	3	0	0,944	3	0	0	2,31
1	0	0	0,357	3	0	1	3,85
1	0	1	0,723	3	0	2	6,36
1	0	2	1,10	3	1	0	4,27
1	1	0	0,736	3	1	1	7,49
1	1	1	1,12	3	1	2	11,5
1	2	0	1,14	3	1	3	15,9
1	2	1	1,54	3	2	0	9,33
1	3	0	1,57	3	2	1	14,9
2	0	0	0,918	3	2	2	21,5
2	0	1	1,43	3	2	3	29,2
2	0	2	1,99	3	3	0	24,0
2	1	0	1,47	3	3	1	46,2
2	1	1	2,05	3	3	2	110
2	1	2	2,68	3	3	3	-

**CATATAN** Bila Inokulasi contoh 0,1; 0,01; 0,001 g atau ml untuk masing-masing 3 tabung, kalikan hasilnya dengan 10.

### A.16.3 Kapang

#### A.16.3.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

#### A.16.3.2 Pembenihan dan pengencer

- *Peptone dilution fluid* atau *pepton water*
- PDA (*Potato Dextrose Agar*) atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *Malt Extract Agar*) yang ditambah dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin (250 ml pembenihan ditambah dengan 1 ml larutan 1 g antibiotik dalam 100 ml air suling steril)
- PDA (*Potato Dextrose Agar*)
 

<i>Infusion from white potatoes</i>	200 g
<i>Dextrose</i>	20 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Air suling</i>	1 liter

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai  $50^\circ\text{C}$  dan pH diatur 3.5 dengan asam tartrat 10% steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam piringan petri.



**A.16.3.3 Peralatan**

- Cawan petri (100 x 15 mm).
- Pipet ukur 1 ml dan 10 ml.
- Penangas air ( $45 \pm 1$ ) °C.
- Lemari pengeringan 25°C atau suhu kamar.
- Alat penghitung koloni.
- Mikroskop

**A.16.3.4 Cara kerja**

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai butir A.16.1.4 bagian a.
- Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran  $10^1 - 10^2$  ke dalam cawan petri steril secara duplo. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu  $45 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ ) sebanyak 15 – 20 ml ke dalam cawan petri dan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
- Setelah pembedihan membeku, inkubasikan pada suhu ( $25 \pm 1$ ) °C selama 5 hari (tanpa dibalik).
- Hitung koloni kapang (dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai kelima).
- Laporkan atau catat hasil sebagai jumlah kapang per g contoh.

**A.16.3.5 Pernyataan hasil**

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan factor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- (1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- (2) Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).
- (3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.



## Bibliografi

Codex alimentarius commission 1994, codex stan 1521985 (amended 1991, *codex standard for wheat flour* in codex alimentarius volume V11: *codex standards for cereals, pilses, legumes, derived products*, food and agricultural organization of the united nations, world health organization, second edition, rome.

AOAC Official Method, 2000 925.08, *Sampling of flour*.

AOAC Official Method, 2000 925.10 *Determination solid (total) and moisture in flour*.

AOAC Official Method, 2000 923.03 *Determination ash of flour*.

AOAC Official Method, 2000 960.52 *Micro Chemical Determination of Nitrogen*.

AOAC Official Method, 2000 940.40. *Copper in food. AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 969.32. *Zinc in food. AAS Method*.

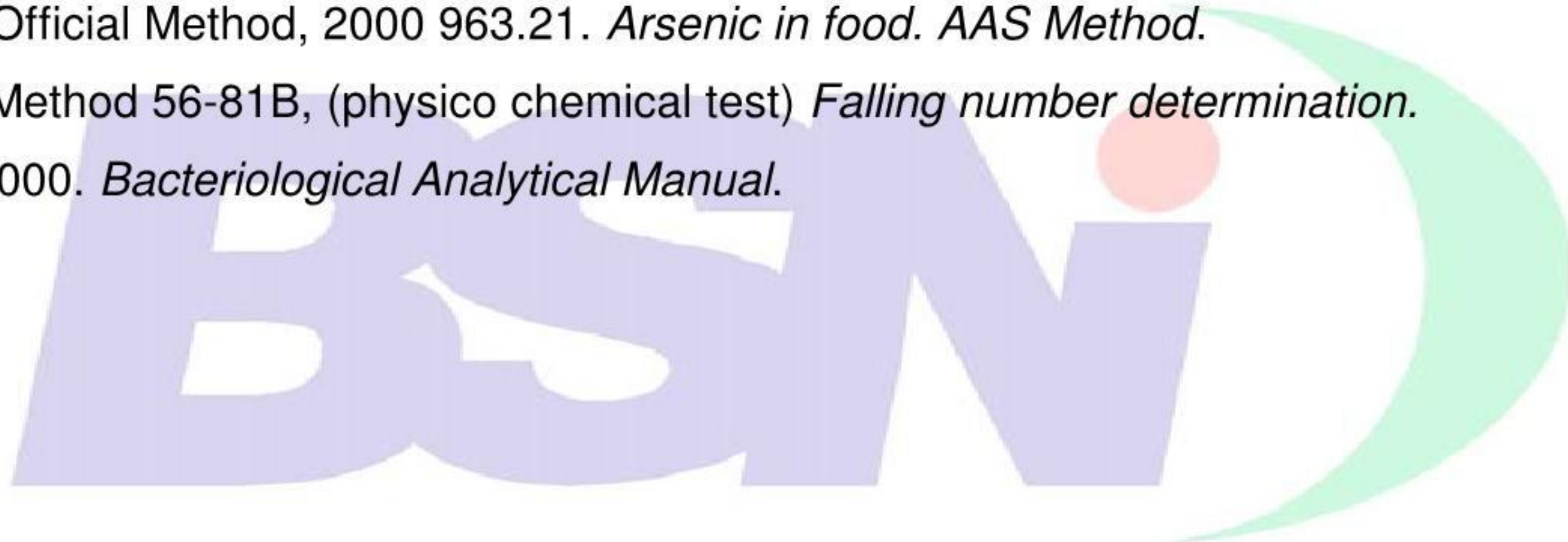
AOAC Official Method, 2000 975.25. *Lead in food. AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 971.21. *Mercury in food. Flameless AAS Method*.

AOAC Official Method, 2000 963.21. *Arsenic in food. AAS Method*.

AACC Method 56-81B, (physico chemical test) *Falling number determination*.

BAM, 2000. *Bacteriological Analytical Manual*.



















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)